

## BIOSYNTHÈSE DE LA MÉLANINE CHEZ *SORDARIA MACROSPORA*

M.L. BOUILLANT, P. GROUT, J. BERNILLON, J. FAVRE-BONVIN,  
N. SALIN et N. ARPIN

Laboratoire de Mycochimie (UA CNRS 1127) I.C.B.M.C.,  
Université Claude Bernard Lyon I, 69622 Villeurbanne Cedex

**RÉSUMÉ** - La voie de biosynthèse de la mélanine chez *Sordaria macrospora* a été établie par l'identification des métabolites précurseurs excrétés d'une part dans le milieu de culture du champignon traité par un inhibiteur de mélanogénèse, le tricyclazole, et d'autre part dans celui de souches mutantes altérées dans leur pigmentation. Ces métabolites, de nature pentacétylique, caractérisent une voie de mélanogénèse découverte chez d'autres Ascomycètes et qui s'effectue par polymérisation du dihydroxy-1,8 naphthalène (DHN).

**ABSTRACT** - Melanin biosynthetical pathway in *Sordaria macrospora* has been established using precursor metabolites identification. These substances were isolated both from the culture medium of the fungus treated with a melanogenesis inhibitor, such as tricyclazole, and from that of mutant strains altered in their pigmentation. These metabolites are pentaketides and characterise a melanogenetic pathways found in some other Ascomycetes and achieved by 1,8-dihydroxy naphthalene (DHN) polymerization.

**MOTS CLÉS** : *Sordaria macrospora*, Ascomycètes, biosynthèse, mélanine, dihydroxy-1,8 naphthalène.

### INTRODUCTION

Les recherches récentes entreprises sur les voies de mélanogénèse fongique s'expliquent par le rôle que peut jouer la mélanine dans la pathogénicité des espèces: elle sert de protection, vis-à-vis d'agents du milieu (biotiques ou abiotiques), pour les organes de conservation (sclérotés, chlamydo-spores), mais, surtout, sa présence paraît importante pour la pénétration de la plante par certains parasites. Ainsi, chez des pathogènes comme *Pyricularia oryzae* ou *Colletotrichum lagenarium*, ce sont des appressoriums, structures auxquelles la mélanine confère la rigidité, qui serviront à envahir l'hôte.

En empêchant la mélanogénèse, on diminue donc considérablement la capacité d'envahissement de l'hôte par le parasite. Ainsi, des inhibiteurs chimiques de mélanogénèse appelés antipénétrants, tel que le tricyclazole, sont utilisés

pour lutter contre la pyriculariose. On comprend donc bien, dès lors, l'intérêt porté ces dernières années aux processus de mélanogenèse.

Divers travaux, récapitulés dans la mise au point exhaustive de Bell & Wheeler (1986), ont permis de montrer qu'il existait, chez les champignons, plusieurs voies de biosynthèse des mélanines, originales et spécifiques:

- \* voie du  $\gamma$ -glutaminyl-1 dihydroxy-3,4 benzène (GDHB),
- \* voie du catéchol,
- \* voie des polyacétates *via* le dihydroxy-1,8 naphthalène (DHN).

La voie de biosynthèse animale (polycondensation oxydative de la dihydroxy phénylalanine-DOPA-) n'a pas été démontrée, jusqu'ici, chez les champignons.

La voie qui nous intéresse ici, celle du DHN, semble être particulière aux Ascomycètes. Elle fut mise en évidence chez *Verticillium dahliae* par Bell & al. (1976a, b) et Stipanovic & Bell (1977) en utilisant des mutants déficients en mélanine. Les principaux précurseurs de la voie ont été déterminés: scytalone, trihydroxy-1,3,8 naphthalène, vermélone, dihydroxy-1,8 naphthalène, de même qu'un certain nombre de produits de dérivation également présents dans le milieu de culture (Fig. 1). Toutes ces molécules sont issues d'une première condensation polyacétylique (5 molécules d'acétate) et, à la suite de plusieurs réductions et déshydratations, conduisent au DHN, monomère présumé de la mélanine. Les mutations altérant la mélanisation concernent en général deux activités enzymatiques spécifiques de la voie, à savoir les déshydratases ou les réductases. Le tricyclazole est un inhibiteur spécifique de cette voie. Ses sites d'action sont localisés, selon Tokousbalides & Sisler (1979) et Woloshuk & al. (1980), au niveau des activités réductases. C'est d'ailleurs une étude d'activité de cette molécule sur plusieurs espèces (Wheeler, 1983) qui a permis de soupçonner l'existence de la voie du DHN chez de nombreux Ascomycètes et Deutéromycètes. Cependant, le nombre d'espèces chez lesquelles la voie a été bien étudiée demeure restreint.

A la suite de l'observation (Leblon, comm. pers.) de la décoloration du mycélium de *Sordaria macrospora* par le tricyclazole, nous avons entrepris l'étude de la mélanogenèse de ce champignon, dont nous avons précédemment étudié les conditions de fructification (Roure & Bouillant, 1986). Cet Ascomycète présente une reproduction sexuée de type homothallique, au cours de laquelle la mélanisation rythme les différenciations successives - mélanisation des hyphes qui donnent naissance à des périthèces blancs devenant noirs, à l'intérieur desquels se forment des ascospores noires -. Pour cette recherche, nous disposons, en outre, de plusieurs souches mutantes, altérées dans leur pigmentation, isolées, et bien caractérisées génétiquement, par Zickler & al. (1984).

D'après les résultats que nous avons déjà obtenus en recherchant les métabolites excrétés par cette espèce (Bouillant & al., 1988), il semble que la voie des polyacétates soit très active chez *Sordaria macrospora*. En effet, plusieurs molécules nouvelles (Fig. 2), formées par condensation polyacétylique (6 molécules d'acétate), ont été identifiées; parmi celles-ci, le sordarial et son produit de réduction le sordariol. Des substances analogues existent chez *Pyricularia oryzae*; l'une d'elles, le pyriculol, (Iwasaki & al., 1969, 1973) phytotoxique, est considérée comme en partie responsable de la pyriculariose.

Ces analogies biochimiques font de *Sordaria macrospora*, bien que non phytopathogène, un modèle biologique tout à fait propice pour étudier non seulement les précurseurs des mélanines, mais également la production de polyacétates éventuellement phytotoxiques.

Par le présent travail, nous avons confirmé la voie de biosynthèse de la mélanine chez *S. macrospora* en étudiant les métabolites libérés dans le milieu de culture:

- par la souche sauvage traitée avec du tricyclazole,
- par différents mutants altérés dans leur pigmentation, comparativement à ceux produits par la souche sauvage non traitée.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Les Souches

La souche sauvage et les 3 souches mutantes de *Sordaria macrospora* (Auersw.) nous ont été données par G. Leblon (Laboratoire des Interactions Moléculaires Génomiques, Université Paris-Sud, Orsay). N° de souche (mutation): 2716(B15), 1901(B12), 2144(J14).

### Milieu et Conditions de Culture

Le milieu utilisé est préparé à partir des solutions mères suivantes: I.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50g l, II.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  60g l, III.  $\text{MgSO}_4$  50g l, IV. Oligoéléments pour 100ml  $\text{H}_2\text{O}$ : Ac. citrique. 1H<sub>2</sub>O 5g;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  5g;  $(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  1g;  $\text{CuSO}_4$  0,25g;  $\text{MnSO}_4$  0,05g;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,05g;  $\text{NH}_4\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,05g;  $\text{CHCl}_3$  1ml, V. Biotine 50mg l EtOH 50%, VI. Thiamine.HCl 100mg l  $\text{H}_2\text{O}$ . Pour 1l de milieu on mélange: I, 10ml; II, 10ml; III, 10ml; IV, 0,1ml; V, 0,5ml; VI, 0,5ml; glucose 10g; extrait de levure 3g;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1000ml. Les milieux solides sont préparés en ajoutant 15g d'agar. Pour l'étude des métabolites, les cultures sont réalisées en milieu liquide: soit en erlens de 250ml contenant 50ml de milieu pour la production et l'isolement des composés excrétés, ainsi que pour le test préliminaire d'inhibition par différentes concentrations de tricyclazole, soit en erlens de 25ml contenant 10ml de milieu pour les études cinétiques. L'incubation a lieu à l'obscurité, à 20-24°C.

### Supplémentation par le tricyclazole

Le tricyclazole (méthyl-5' triazolo-1,2,4 [3,4-b] benzothiazole) est ajouté au milieu de culture, en solution acétonique (maximum 20 $\mu$ l par erlen de 25ml, pour limiter la toxicité du solvant), à partir de solutions mères calculées pour obtenir les concentrations finales de 0,1, 0,5, 1, 5 et 10ppm. Les concentrations supérieures nécessitent l'addition d'une plus grande quantité de solvant dont l'effet sur la croissance mycélienne n'est pas négligeable.

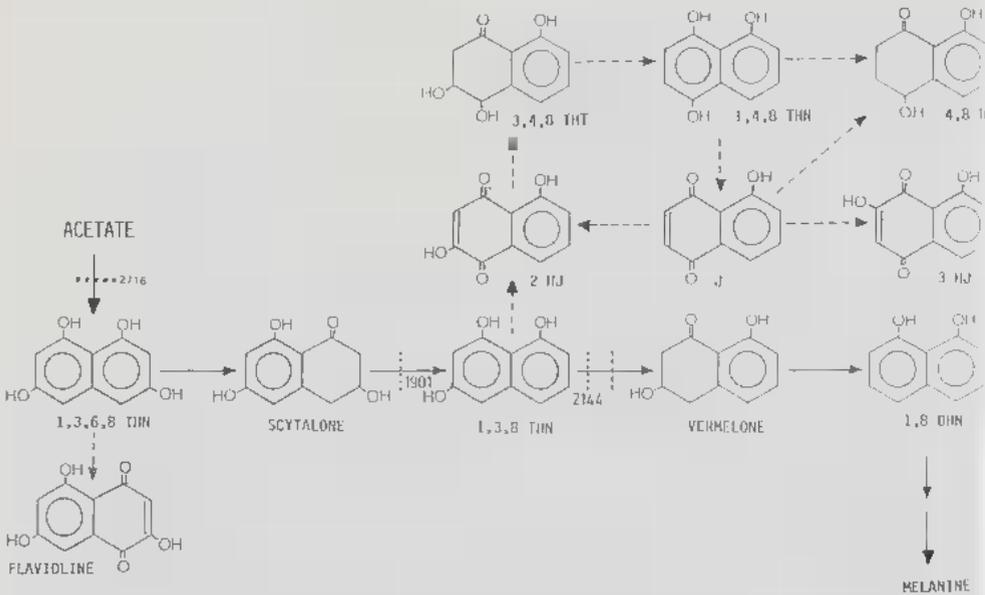


Fig. 1 - Voie de biosynthèse de la DHN mélanine et voies dérivées: site d'inhibition du tricyclazole (----); mutants de *S. macrospora* (.....).

Fig. 1 - Pathway of DHN melanin biosynthesis and branched pathways: site of inhibition by tricyclazole (----); mutants of *S. macrospora* (.....).

### Extraction et Isolement des métabolites

Les milieux de culture, après incubation, sont séparés du mycélium par filtration et extraits par l'acétate d'éthyle (2 x 1 vol), ou le n-butanol (1 x 1 vol). Après évaporation des solvants, les résidus secs sont repris par un volume minimal de méthanol. Pour l'isolement des métabolites, les extraits bruts sont fractionnés, d'abord sur colonnes de polyamide acétylé (MN DC<sub>6</sub> Ac) éluées successivement par: hexane, hexane-acétate d'éthyle 1:1, acétate d'éthyle et enfin acétate d'éthyle-méthanol 8:2, ou sur CCM avec centrifugation (Chromatotron) sur gel de silice (60 PF<sub>254</sub> Merck), dans hexane-acétate d'éthyle-méthanol 6:4:1, ensuite par CLHP préparative (colonne en phase inverse C<sub>18</sub> Merck, 7 $\mu$ , Ø 25, L 250mm) ou semi-préparative (id. Ø 0,8mm), en conditions isocratiques. Solvant: acétonitrile - H<sub>2</sub>O de 25 à 50%, suivant la polarité des produits. Les études cinétiques sont réalisées à partir de cultures du 2ème au 11ème jour. Le mycélium est pesé, après lyophilisation, et le milieu extrait comme précédemment. Les extraits, en solution méthanolique, sont directement analysés en CLHP: colonne phase inverse Altex, C<sub>18</sub>, 5 $\mu$ , Ø 4, L 250mm, gradient de solvants: A/ H<sub>2</sub>O + 2% d'acide acétique; B/ acétonitrile-H<sub>2</sub>O-acide acétique 75:25:2; 8% de B dans A à 45% de B dans A, en 35mn, 1ml/mn (Greenblatt & Wheeler, 1986). Double détection UV à 254 et 295 nm.

### Les composés isolés

Les échantillons témoins: tétrahydroxy-1,3,6,8 naphthalène, trihydroxy-1,3,8 naphthalène, vermélone, hydroxy-2 juglone ont été synthétisés par M. Gaudry (Laboratoire de Chimie Biologique, Université Paris VI), les autres substances ont été isolées et caractérisées dans notre laboratoire à partir de *S. macrospora*: scytalone, par extraction du milieu de culture (5 jours) du mutant 1901, dihydroxy-4,8 tétralone (DHT), par extraction du milieu de culture (5 jours) du mutant 2144.

## RÉSULTATS

### Étude des métabolites excrétés par la souche sauvage traitée par le tricyclazole

Le fait de traiter *S. macrospora* avec le tricyclazole entraîne une légère décoloration du mycélium, mais surtout une coloration orangée du milieu de culture due à l'accumulation de métabolites excrétés. L'extraction, par l'acétate d'éthyle, de ce milieu de culture à divers temps d'incubation, nous a permis d'identifier par CCM et CLHP comparatives avec des témoins synthétiques:

- le trihydroxy-1,3,8 naphthalène (1,3,8-THN),
- l'hydroxy-2 juglone (2HJ),
- la dihydroxy-4,8 tétralone-1 (4,8-DHT),
- la flavioline (présente uniquement dans l'extrait butanolique).

Ces composés ne sont pas excrétés par la souche sauvage non traitée, qui, par contre, accumule les hexaacétates, sordariol, cyclosordariolone et heptacyclosordariolone dont nous avons récemment démontré les structures (Bouillant & al., 1988, 1989).

Les cinétiques d'apparition et d'accumulation de ces différents composés (hormis la flavioline) après supplémentation du milieu de culture par différentes concentrations de tricyclazole ont été étudiées. Aux concentrations utilisées (la plus efficace étant 5 ppm), l'accumulation des métabolites de la voie de melanogenèse commence à l'issue de la croissance exponentielle (au 3ème jour). 1,3,8-THN et 2-HJ ont des maximums de production plus précoces (aux 4ème et 5ème jours) que la 4,8-DHT (7ème et 8ème jours); mais le taux d'accumulation des deux premiers décroît rapidement. Par contre, le dernier demeure présent jusqu'en fin de culture, même lorsque le champignon est traité par des concentrations supérieures à 10 ppm, théoriquement inhibitrices de la formation de ce composé (Tokousbalides & Sisler, 1978).

La comparaison, chez la souche traitée ou non traitée, de l'évolution du poids de matière sèche montre que, de 0,5 à 10 ppm, le tricyclazole n'affecte pas la croissance du champignon. Par contre, la formation des périthèces est retardée. A des concentrations supérieures la croissance est réduite et le retard de développement augmente.

### Étude des métabolites excrétés par des souches mutantes altérées dans leur pigmentation

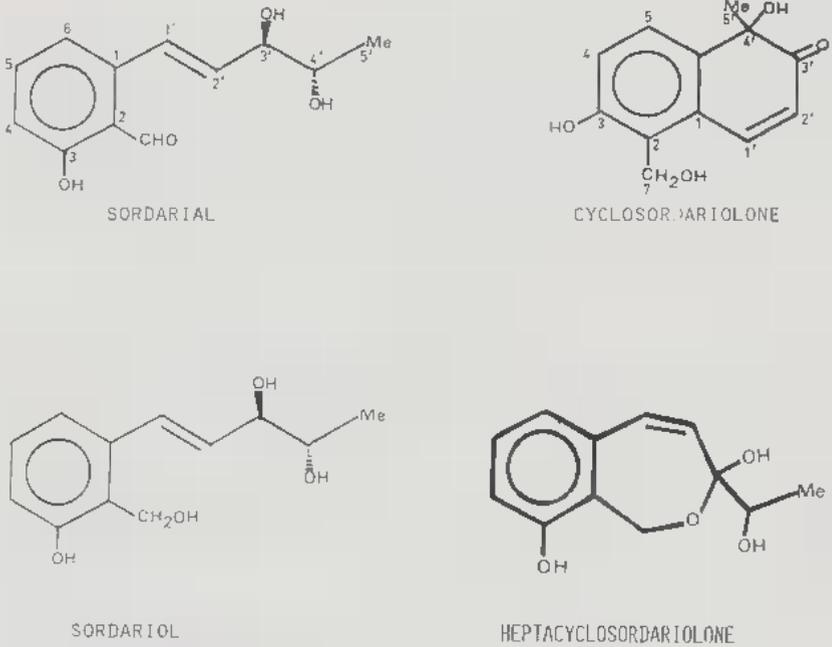


Fig. 2 - Hexacétates de *S. macrospora*.  
 Fig. 2 - Hexaketides of *S. macrospora*.

- Souche 2144: cette souche excrète dans le milieu de culture de nombreux métabolites qui confèrent à ce dernier une forte coloration orangée. Le mycélium se colore progressivement, pour devenir brun foncé en fin de culture. Dans l'extrait par l'acétate d'éthyle du milieu de culture, nous avons identifié essentiellement: le 1,3,8-THN, la 2-HJ et la 4,8-DHT. L'accumulation des 2 premiers composés est très fugace et n'est vraiment visible qu'aux 4ème et 5ème jour d'incubation. Par contre, la 4,8-DHT, dont l'excrétion est décalée dans le temps par rapport aux composés précédents demeure importante, même en fin de culture.

- Souche 1901: il s'agit d'une souche beaucoup plus claire que la précédente (coloration rose). Elle excrète également de nombreux métabolites dans son milieu de culture (rose-orangé). Après purification et isolement, nous avons identifié comme composé majoritaire, la scytalone, premier intermédiaire connu de la voie du DHN. La flavioline est présente dans l'extrait butanolique. Aucun autre dérivé connu de la voie de mélanogénèse n'a été mis en évidence dans cette souche; par contre, les substances de la voie sordariol sont largement représentées et parmi elles, le sordarial, aldéhyde correspondant au sordariol, abondant ici, alors qu'il n'existe qu'à l'état de trace dans la souche sauvage.

- Souche 2716: cette souche développe un mycélium très clair et un milieu de culture également peu coloré. Aucun des précurseurs mélanogénétiques n'est présent dans les extraits du milieu de culture. Seules les substances de type sordariol (là encore, le sordarial) sont excrétées en abondance.

## DISCUSSION

La démonstration de la présence, chez *Sordaria macrospora*, de métabolites tels que la scytalone ou le 1,3,8-THN, soit sous l'action du tricyclazole, soit dans des souches mutantes non mélanisées, permet de conclure que la voie de biogenèse de la mélanine chez cette espèce est bien la voie du DHN. *S. macrospora* se comporte ainsi comme d'autres Ascomycètes.

Parmi les 3 souches mutantes étudiées, la souche 2144 mime l'effet du tricyclazole sur la souche sauvage: un blocage au niveau de la réductase qui transforme le 1,3,8-THN en vermélone. La présence de composé dérivés du 1,3,8-THN confirme ce résultat. Cependant, la coloration foncée prise par le mycélium en fin de culture laisse présager la formation d'autres pigments de type mélanique par une ou des voies dérivées qui pourraient être présentes ou activées lorsque la voie principale est bloquée. Il n'est pas chimiquement impossible que les produits dérivés puissent être eux-mêmes polymérisables en mélanines.

Par contre, les 2 autres souches étudiées ne semblent pas avoir la faculté de synthétiser des pigments bruns. La souche 2716 est une souche albinos qui peut être rapprochée du mutant alm-1 de *Verticillium dahliae*, un blocage précoce empêche la formation de tout précurseur mélanique connu. La souche 1901, qui accumule la scytalone, semble être l'équivalent du mutant brm-1 de *V. dahliae*. Cependant, ce dernier excrète également de la vermélone que nous avons vainement recherchée dans les extraits issus de la souche 1901. Dans ces 2 souches claires, l'accumulation de composés de type sordariol est remarquable, surtout celle du sordarial qui semble prouver l'altération d'une fonction de réduction (celle du groupement aldéhyde).

Les 3 mutants étudiés ont un développement normal, ce qui confirme que, si la mélanogénèse est liée à la fructification, elle ne lui est pas indispensable. Cependant, la survie de tels organismes serait-elle possible ailleurs qu'au laboratoire (voir Arpin & Bouillant, 1988)? A la suite de ce travail, nous envisageons d'étudier d'une part les interactions possibles entre les 2 métabolismes polyacétyliques mis en évidence chez *S. macrospora*, et d'autre part leur éventuelle corrélation au développement sporal. Les composés présents pourraient constituer de bons marqueurs pour une telle recherche.

## BIBLIOGRAPHIE

- ARPIN N. et BOUILLANT M.L., 1988 - Métabolites secondaires fongiques: diversité de structures mais unité de fonction, la protection. *Cryptogamie, Mycol.* 9: 267-276.
- BELL A.A., STIPANOVIC R.D. and PUHALLA J.E., 1976a - Pentaketides metabolites of *Verticillium dahliae*. Identification of (·) scytalone as a natural precursor to melanin. *Tetrahedron* 32: 1353-1356.

- BELL A.A., PUHALLA J.E., TOLMSTOFF W.J. and STIPANOVIC R.D., 1976b - Use of mutants to establish (+) scytalone as an intermediate in melanin biosynthesis by *Verticillium dahliae*. *Canad. J. Microbiol.* 22: 787-799.
- BELL A.A. and WHEELER M.H., 1986 - Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Rev. Phytopathol.* 24: 411-451.
- BOUILLANT M.L., FAVRE-BONVIN J., SALIN N. and BERNILLON J., 1988 - Sordariol and related compounds, hexaketides in the fungus *S. macrospora*. *Phytochemistry* 27: 1517-1519.
- BOUILLANT M.L., BERNILLON J., FAVRE-BONVIN J. and SALIN N., 1989 - New hexaketides related to Sordariol in *Sordaria macrospora*. (à paraître).
- IWASAKI S., NOZOE S., OKUDA S., SATO Z. and KOZATA T., 1969 - Isolation and structural elucidation of a phytotoxic substance produced by *Pyricularia oryzae* cavara. *Tetrahedron Lett.* n° 45: 3977-3980.
- IWASAKI S., MURO H., SASAKI K., NOZOE S. and OKUDA S., 1973 - Isolation of phytotoxic substances produced by *Pyricularia oryzae* cavara. *Tetrahedron Lett.* n° 37: 3537-3542.
- GREENBLATT G.A. and WHEELER M.H., 1986 - HPLC Analysis of fungal melanin intermediates and related metabolites. *J. Liquid Chromatogr.* 9: 971-981.
- ROURE M. and BOUILLANT M.L., 1986 - Development and application of a bioassay to study the effects of nutrients, pH and active substances on *Sordaria macrospora* fruiting. *Canad. J. Microbiol.* 32: 930-936.
- STIPANOVIC R.D. and BELL A.A., 1977 - Pentaketides metabolites of *Verticillium dahliae*. II. Accumulation of naphthol derivatives by the aberrant-melanin mutant brm-2. *Mycologia* 69: 164-172.
- TOKOUSBALIDES M.C. and SISLER H.D., 1978 - Effect of Tricyclazole on Growth and Secondary Metabolism in *Pyricularia oryzae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 8: 26-32.
- TOKOUSBALIDES M.C. and SISLER H.D., 1979 - Site of inhibition by Tricyclazole in the Melanin Biosynthetic Pathway of *Verticillium dahliae*. *Pest. Biochem. Physiol.* 11: 64-73.
- WHEELER M.H., 1983 - Comparisons of fungal melanins biosynthesis in ascomycetous, imperfect and basidiomycetous fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 81: 29-36.
- WOLOSHUK C.P., SISLER H.D., TOKOUSBALIDES M.C. and DUTKY S.R., 1980 - Melanin Biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: site of tricyclazole inhibition and Pathogenicity of Melanin Deficient Mutants. *Pest. Biochem. Physiol.* 14: 256-264.
- ZICKLER D., IEBLON G., HAEDENS V., COLLARD A. and THURIAUX P., 1984 - Linkage group chromosomes correlation in *Sordaria macrospora*. Chromosome identification by tridimensional reconstruction of their synaptonemal complex. *Curr. Genet.* 8: 57-67.